

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 7 月 4 日 (04.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/051998 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K  
16/40, C12N 5/10, 9/50, G01N 33/15, 33/50, 33/573 //  
C12P 21/08, C12Q 1/37

薬株式会社内 Ibaraki (JP). 荻野 淳 (OGINO, Makoto)  
[JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山  
之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11251

(74) 代理人: 森田 憲一, 外 (MORITA, Kenichi et al.); 〒  
173-0004 東京都 板橋区 板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋  
中央ビル 5 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 21 日 (21.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO,  
NZ, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-393372  
2000 年 12 月 25 日 (25.12.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内  
製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL  
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都 中央区 日本橋  
本町二丁目 3 番 1 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山地 昇 (YA-  
MAJI, Noboru) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市  
御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 西  
村 耕一 (NISHIMURA, Kouichi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨  
城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会  
社内 Ibaraki (JP). 阿部 邦威 (ABE, Kunitake) [JP/JP]; 〒  
305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製

添付公開書類:  
--- 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEASE

(54) 発明の名称: 新規プロテアーゼ

(57) Abstract: A novel polypeptide; a polynucleotide encoding this polypeptide; an expression vector containing this polynucleotide; cells transfected with this expression vector; an antibody binding to the above polypeptide or a fragment thereof; and a process for producing the above polypeptide. The above-described polypeptide is a novel protease.

(57) 要約:

新規ポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、前記発現ベクターでトランスフェクションされた細胞、前記ポリペプチドに結合する抗体又はその断片、及び前記ポリペプチドの製造方法を開示する。

前記ポリペプチドは、新規プロテアーゼである。

WO 02/051998 A1

## 明 細 書

## 新規プロテアーゼ

## 技術分野

本発明は、新規なプロテアーゼに関する。

## 背景技術

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motif) は、ディスインテグリン様ドメイン、金属プロテアーゼ様ドメイン、及びトロンボスポンジン I 型繰り返し配列（以下、TSP-1 繰り返し配列と称する）を含む分子群であり、現在までに 9 種のヒト ADAMTS 分子が報告されている。

前記ヒト ADAMTS 分子の中で、ADAMTS 4（アグリカナーゼ-1）及び ADAMTS 11（アグリカナーゼ-2）では、細胞外基質アグリカン（第 373 番目のグルタミン酸残基と第 374 番目のアラニン残基との間（Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間）で選択的に切断する活性が示され、関節炎や変形性関節症における軟骨細胞外基質アグリカンの分解の本体の酵素である可能性が示唆されていた（Tortorella M. D. ら, Science, 284, 1664-1666, 1999; 及び Abbaszade I. ら, J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）。また、ADAMTS 2（プロコラーゲン I N-プロテイナーゼ）は、I 型コラーゲンプロ体の N 末部の切断除去酵素として、I 型コラーゲンのプロ体から成熟型への転換に関与し、コラーゲン線維の形成に重要な役割を果たしており、その遺伝子の異常と VIIC 型エーラーズ・ダンロス（Ehlers-Danlos）症候群との関連性が示されている（Colige A. ら, Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999）。

すなわち、ADAMTS 分子は、アグリカンやコラーゲン等の細胞外マトリクスの分解及び成熟といった代謝に関与することが示されている。

一方、慢性腎不全は、糸球体硬化及び腎間質線維化を特徴とする疾患であり、細胞外マトリクス成分の質的变化及び／又は量的増加が主要な発病及び進行機序とされている。腎不全疾患モデルを用いた実験において、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の特異的な作用抑制タンパク質であるデコリンの遺伝子導入 (Isaka Y. ら, Nature Med., 2, 418-423, 1996) や抗TGF- $\beta$  投与 (Ziyadeh F. N. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 8015-8020, 2000; Sharma K. ら, Diabetes, 45, 522-530, 1996; 及び Border W. A. ら, Nature, 346, 371-374, 1990) が有効性を示したことより、TGF- $\beta$  の生理機能を抑制又は阻害することが慢性腎不全の治療に繋がると考えられている。

しかし、満足のいく慢性腎不全治療薬がない現状のもと、期待されているにも係わらず、現在までにTGF- $\beta$  阻害剤は上市されていない。

#### 発明の開示

TGF- $\beta$  は、多種多様の生理機能を示す分化及び成長因子であるため、TGF- $\beta$  の生理機能全てを阻害することは、長期投与が想定される慢性腎不全の治療においては副作用の観点から危険である。TGF- $\beta$  の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的变化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害することが望ましい。

本発明の課題は、TGF- $\beta$  により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与する、慢性腎不全治療剤のスクリーニングツールとして有用な新規のプロテアーゼ、及びそれをコードする新規のポリヌクレオチドを提供することにある。

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、ヒト胎児腎臓cDNAより、配列番号2で表される配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列からなり、1224個のアミノ酸残基からなる新規プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドを見出した。更に、本発明者は、この新規プロテアーゼの750アミノ酸残基からなるN末端側部分断片も、十分なプロテアーゼ活性を有することを見出した。また、前記プロテアーゼは、(1) ADAM

T S プロテアーゼに分類されることより、細胞外マトリックスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられること、(2) 実際に、ヒトの腎臓での発現が認められること、(3) 腎臓の初代培養細胞において、T G F- $\beta$ により発現誘導されること、及び(4) 腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加していることを見出した。これらにより、本発明のプロテアーゼは、腎不全の原因となるポリペプチドであり、本発明のポリペプチドを用いて、そのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングすることにより、T G F- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する慢性腎不全治療剤として有用な物質をスクリーニングすることができることを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

[1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[3] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[4] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、

90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[5] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[6] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド；

[7] [1] ～ [6] 記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[8] [7] 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター；

[9] [8] 記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞；

[10] [1] ～ [6] 記載のポリペプチドに結合する抗体又はその断片；

[11] [9] 記載の細胞を培養し、[1] ～ [6] 記載のポリペプチドを回収することを含む、[1] ～ [6] 記載のポリペプチドの製造方法；

[12] (1) [1] ～ [6] 記載のポリペプチドと、(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び

前記ポリペプチドと $\alpha_2$ -マクログロブリンとが、SDS及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成するか否かを分析する工程

を含む、試験化合物が前記ポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する方法；

[13] [12] 記載の方法による検出工程、及び

プロテアーゼ活性を阻害する物質を選択する工程

を含む、[1] ～ [6] 記載のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法；

[14] [13] 記載の方法により、慢性腎不全治療用物質をスクリーニングする方法；並びに

[15] [12] 記載の方法による検出工程、及び

## 製剤化工程

を含む、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法に関する。

本明細書において「プロテアーゼ活性」とは、血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質である $\alpha_2$ -マクログロブリンと、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成することのできる性質を意味する。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

### [1] 本発明のポリペプチド

本発明のポリペプチドには、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド；
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、全体として1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）；並びに
- (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）が含まれる。

本発明のポリペプチドである「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド」は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、例えば、

(1 a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 750 番のアミノ酸からなるポリペプチド；

(1 b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 750 番のアミノ酸からなる配列の N 末端及び／又は C 末端に、適当なマーカー配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド；

(1 c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 750 番のアミノ酸からなる配列の C 末端に、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 751 番～第 1224 番のアミノ酸からなる配列又はその C 末端から 1～473 個のアミノ酸が欠失した配列が付加されたアミノ酸配列〔すなわち、C 末端が第 751 番～第 1224 番のアミノ酸のいずれかである；以下、「配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又はその C 末端欠失配列」と称する〕を有するポリペプチド；並びに

(1 d) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又はその C 末端欠失配列において、その N 末端及び／又は C 末端に、適当なマーカー配列等が更に付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチドなどが含まれる。

本明細書において、或るポリペプチド（以下、試験ポリペプチドと称する）が「プロテアーゼ活性を示す」か否かを判定する方法（以下、「プロテアーゼ活性の判定方法」と称することがある）は、「血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質である  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、SDS 及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成することのできる性質」を示すか否かを判定することができる限り、特に限定されるものではないが、例えば、前記の試験ポリペプチドと、血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質である  $\alpha_2$ -マクログロブリンとを接触させ、SDS 及び／又は還元剤〔例えば、2-メルカプトエタノール（2-ME）〕では解離しない複合体を形成するか否かを分析することにより、確認することができ、具体的には、例えば、実施例 4 に記載の方法で確認することができる。

$\alpha_2$ -マクログロブリンは、血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質であり、多くのプロテアーゼと複合体を形成することが知られている。この複合体

の形成はプロテアーゼ活性に依存しており、また、形成された複合体は、プロテアーゼと $\alpha_2$ -マクログロブリンとがアミド結合したものであるため、SDS又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しないことが知られている（Feinman R. D. ら, Ann. New York Acad. Sci., 737, 245-266, 1994; 及びKuno K. ら, J. Biol. Chem., 274, 18821-18826, 1999）。

前記ポリペプチド（1a）、すなわち、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド」は、プロテアーゼ活性を示す、750個のアミノ酸残基からなる新規プロテアーゼである。前記ポリペプチド（1a）は、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド」の部分ポリペプチドに相当する。

本発明のポリペプチドにおける前記マーカ配列としては、例えば、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGタグ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明の機能的等価改変体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個（例えば、1～数個）のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、その起源もヒトに限定されない。

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドのヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体）をコードするポリヌクレオチドを元にして、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌク



レオチドを元にして、遺伝子工学的に人為的に改変したポリヌクレオチドを用いて製造したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体は、当業者であれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列(例えば、配列番号1で表される塩基配列)の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法(例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)に従って実施することが可能である。

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物[例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ)]由来の試料(例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー)とを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法(Saiki, R. K. ら, Science, 239, 487—491, 1988)又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、ポリペプチドコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例4に記載の方法により、プロテアーゼ活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドは、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法(site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

8 1, 5 6 6 2-5 6 6 6, 1 9 8 4) により、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例 4 に記載の方法により、プロテアーゼ活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

本発明の機能的等価改変体には、例えば、

(2 a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 7 5 0 番のアミノ酸からなる配列の 1 又は複数の箇所において、全体として 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

(2 b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 7 5 0 番のアミノ酸からなる配列の 1 又は複数の箇所において、全体として 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入され、更に、その N 末端及び／又は C 末端に適当なマーカ配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド；

(2 c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 7 5 0 番のアミノ酸からなる配列の 1 又は複数の箇所において、全体として 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入され、更に、その C 末端に、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 7 5 1 番～第 1 2 2 4 番のアミノ酸からなる配列又はその C 末端から 1～4 7 3 個のアミノ酸が欠失した配列が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；並びに

(2 d) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 7 5 0 番のアミノ酸からなる配列の 1 又は複数の箇所において、全体として 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入され、更に、その C 末端に、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 7 5 1 番～第 1 2 2 4 番のアミノ酸からなる配列又はその C 末端から 1～4 7 3 個のアミノ酸が欠失した配列が付加されたアミノ酸配列であって、その N 末端及び／又は C 末端に、適当なマーカ配列等が更に付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド

などが含まれる。

本発明の相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列に関して、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列に関して、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む。本発明の相同ポリペプチドとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上（より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上）であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドがより好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により得られた値を意味し、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ (sgl32 bit 版, バージョン2.0.12; NCBIより入手) のbl2seqプログラム (Tatiana A. Tatusova及びThomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用い、デフォルトパラメーターに従って算出することができる。ペアワイズ・アラインメント・パラメーターとして、プログラム名「blastp」を使用し、Gap挿入Cost値を「0」で、Gap伸長Cost値を「0」で、Query配列のフィルターとして「SEG」を、Matrixとして「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、本発明のポリペプチドとしては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、全体として1～10個（好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、全体として1～10個（好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」が好ましく、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド」がより好ましい。

## [2] 本発明のポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではなく、例えば、配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなる配列を含むポリヌクレオチドを挙げることができ、配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、（１）PCRを用いた方法、（２）常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は（３）化学合成法などを挙げることができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。

前記（１）のPCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明の

ポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。抽出した前記mRNAを鋳型とする逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

より詳細には、まず、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織から、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを含む総RNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンブロッティング法、あるいは、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

続いて、抽出したmRNAを精製する。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えば、mRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAを更に分画することもできる。また、mRNAを抽出しなくても、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いることもできる。

次に、精製されたmRNAを、例えば、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、及び／又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第1鎖cDNAを合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ2種類のプライマーを用いてPCRを実施し、目的とするcDNA

を増幅することができる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

前記(2)の常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

まず、前記のPCRを用いた方法で調製したmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としては、例えば、S1ヌクレアーゼ法(Efstathiadis, A. ら, Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. ら, Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、又はOkayama-Berg法(Okayama, H. 及びBerg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982)などを挙げることができる。

次に、前記2本鎖cDNAを含む組換えプラスミドを作製した後、大腸菌(例えば、DH5 $\alpha$ 株、HB101株、又はJM109株)に導入して形質転換させ、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、又はカナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として、組換え体を選択する。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には、Hanahanの方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、又はRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に、前記組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしては、プラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターを用いることもできる。

このようにして得られる形質転換株から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する方法としては、例えば、以下に示す(i)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる形質転換株スクリーニング法、(ii)PCRにより作製したプローブを用いる形質転換株スクリーニング法、(iii)本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる形質転換株スクリーニング法、又は(iv)セレクトィブ・ハイ

ブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる形質転換株スクリーニング法を採用することができる。

前記 (i) の合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的の cDNA を有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの全部又は一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブ ( $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識する) として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルター又はポリアミドフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。なお、プローブ用のオリゴヌクレオチドを合成する場合には、コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列とすることもできるし、あるいは、考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列とすることもできる。後者の場合には、イノシンを含ませてその種類を減らすことができる。

前記 (ii) の PCR により作製したプローブを用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的の cDNA を有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの一部に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの各オリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せて PCR を行ない、目的ポリペプチドの全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、本発明のポリペプチドを産生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、又はゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA 断片を、例えば、 $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はプラークハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的の cDNA を有する形質転換株を選択する。

前記 (iii) の本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的の cDNA を有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、予め、cDNA を発現ベクターに組み込み、形質転換株の培養上清、

細胞内、又は細胞表面にポリペプチドを産生させ、本発明のポリペプチドに対する抗体及び前記抗体に対する2次抗体を用いて、所望のポリペプチド産生株を検出し、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

前記(iv)のセレクトィブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞から別途調製したmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを適当なポリペプチド翻訳系、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞へ注入したり、あるいは、ウサギ網状赤血球ライゼート又は小麦胚芽等の無細胞系を用いて、ポリペプチドに翻訳させる。本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて検出して、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のポリヌクレオチドを採取する方法は、公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施することができる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、得られたプラスミドDNAからcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

前記(3)の化学合成法を用いた方法では、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。各DNAは、DNA合成機[例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、又は394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など]を用いて合成することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの情報に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. ら, N



ature, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、常法に従って決定することができる (Crant ham, R. ら, Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。更に、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的突然変異誘発法 (site specific mutagenesis) (Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984)等により実施することができる。

これまで述べた種々の方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキシムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. 及び Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. 及び Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982)等により行なうことができる。

### [3] 本発明の発現ベクター及び細胞

単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物又は原核生物の宿主細胞をトランスフェクションすることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターでトランスフェクションされ、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞である

こともできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、及び酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、及び前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) 等を挙げることができる。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. ら, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はサイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社) 等を挙げるることができる。

宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (Invitrogen社) などを用いることができる。

また、宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、S

V40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及び Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又は pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及び Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. 及び van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、市販のトランスフェクション試薬 (例えば、FuGENE™6 Transfection Reagent; Boehringer Mannheim社製) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により、COS細胞に取り込ませることができる。

更に、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又は pSV2-neo (Southern, P. J. 及び Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、本発明のポリペプチドを安定に産生するトランスフェクションされた細胞を得ることができる。

本発明の細胞は、常法 (例えば、日本生化学会編, 「新生化学実験講座18 細胞培養技術」, 東京化学同人, 1990) に従って培養することができ、前記

培養により細胞外に本発明のポリペプチドが生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMI-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清（FBS）等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清（FBS）等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地にG418を加えた培地を使用することができる。

本発明の細胞を培養することにより、前記細胞の細胞外に生産される本発明のポリペプチドは、前記ポリペプチドの物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法（例えば、岡田雅人及び宮崎香編、「改訂タンパク質実験ノート上・下」，羊土社，1999）により、分離精製することができる。具体的には、本発明のポリペプチドを含む培養液を、例えば、通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー〔例えば、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等〕、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、本発明のポリペプチドを精製することができる。

本発明のポリペプチドは、マーカー配列とインフレームで融合して発現させることにより、本発明のポリペプチドの発現の確認、又は精製等が容易になる。前記マーカー配列としては、例えば、FLAGタグ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。また、マーカー配列と本発明のポリペプチドとの間に、プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンビンなど）が認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。

#### [4] 本発明の検出方法及びスクリーニング方法

本発明のポリペプチドを用いると、試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出することができる。また、この本発明の

検出方法を用いると、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングすることができる。本発明のポリペプチドであるMDTS9 (Metalloprotease and Disintegrin with Thrombospondin type-1 repeats 9) は、その配列よりADAMTSプロテアーゼであると考えられることから、細胞外マトリクスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられ、後述の実施例5及び実施例8に示すように、腎臓で発現しているタンパク質であり、しかも、後述の実施例6に示すように、TGF- $\beta$ により誘導されるADAMTSプロテアーゼである。従って、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質は、TGF- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療剤の有効成分として有用であり、本発明のポリペプチドそれ自体を、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。

本発明の検出方法又はスクリーニング方法にかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）又は通常の合成技術によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。前記公知化合物には、例えば、プロテアーゼ阻害活性を有することが知られているが、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性に対して阻害するか否かが不明な化合物（ペプチドを含む）が含まれる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

本発明の検出方法は、

(1) 本発明のポリペプチドと、(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び

本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが、SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成するか否かを分析する工程を含む。

本発明の検出方法においては、試験ポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとを接触させる代わりに、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンと試験化合物とを接触させること以外は、先述のプロテアーゼ活性の判定方法と同様にして実施することができる。すなわち、本発明の検出方法では、本発明のポリペプチドと基質用ポリペプチドと試験化合物とを接触させ、前記試験化合物の存在下において、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成するか否かを分析することにより、前記試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する。試験化合物の存在下において、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成しないか、あるいは、前記形成の程度が減少する場合には、前記試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害すると判断することができる。

本発明のスクリーニング方法では、本発明の検出方法により、試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出し、その結果に基づいて、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質を選択する。より具体的には、例えば、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンと試験化合物とを接触させ、前記試験化合物の存在下における本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとの複合体の形成の有無又は程度を指標として、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質を選択することができる。試験化合物の存在下において、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成しないか、あるいは、前記形成の程度が減少する場合には、前記試験化合物が、本発

明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質であると判定することができる。

#### 〔5〕本発明の慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法

本発明には、本発明のスクリーニング方法により選択される、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質を有効成分とする慢性腎不全治療用医薬組成物が包含される。

慢性腎不全治療用医薬組成物の品質規格の確認試験において、本発明の検出方法により、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

また、前記検出工程を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与又は消化を受けない製剤化手段、例えば、WO 95 / 28963号パンフレットに記載の製剤化手段が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆す

ることができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.01～1000mg、好ましくは0.01～100mgである。また、非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～1000mg、好ましくは0.01～100mgである。

#### 〔6〕本発明の抗体又はその断片

本発明のポリペプチドに反応する抗体（例えば、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）は、各種動物に、本発明のポリペプチド、又はその断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入したプラスミドを用いて、DNAワクチン法（Raz, E.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-952



3, 1994; 又は Donnelly, J. J. ら, J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチド又はその断片を適当なアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントなど）に乳濁した乳濁液を、腹腔、皮下、又は静脈等に免疫して感作した動物（例えば、ウサギ、ラット、ヤギ、又はニワトリ等）の血清又は卵から製造することができる。このように製造された血清又は卵から、常法のポリペプチド単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

モノクローナル抗体は、例えば、ケーラーとミルスタインの細胞融合法（Köhler, G. 及び Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975）により、当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明のポリペプチド又はその断片を適当なアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントなど）に乳濁した乳濁液を、数週間おきにマウスの腹腔、皮下、又は静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、例えば、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損又はチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを有するミエローマ細胞（例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8. U1）を利用することができる。また、融合剤としては、例えば、ポリエチレングリコールを利用することができる。更には、ハイブリドーマ作製における培地として、例えば、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、又はRPMI-1640などの通常よく用いられている培地に、10～30%のウシ胎仔血清を適宜加えて用いることができる。融合株は、HAT選択法により選択することができる。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法又は免疫組織染色法などの周知の方法により行ない、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択することができ

る。また、限界希釈法によってサブクローニングを繰り返すことにより、ハイブリドーマの単クローン性を保証することができる。このようにして得られるハイブリドーマは、培地中で2～4日間、あるいは、プリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日間培養することで、精製可能な量の抗体を産生することができる。

このように製造されたモノクローナル抗体は、培養上清又は腹水から常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAEセルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

また、モノクローナル抗体又はその一部分を含む抗体断片は、前記モノクローナル抗体をコードする遺伝子の全部又は一部を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、又は動物細胞）に導入して生産させることもできる。

以上のように分離精製された抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含む）について、常法により、ポリペプチド分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）によって消化を行ない、引き続き、常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、又はFvを得ることができる。

更には、本発明のポリペプチドに反応する抗体を、クラクソンらの方法又はゼベデらの方法（Clackson, T. ら, Nature, 352, 624-628, 1991; 又はZebedee, S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992）により、一本鎖（single chain）Fv又はFabとして得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス（Lonberg, N. ら, Nature, 368, 856-859, 1994）に免疫することで、ヒト抗体を得ることも可能である。

## 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施した。

#### 実施例 1 : C 末 FLAG 付加型発現ベクターの作製

プラスミド pCEP4（インビトロジェン社製）を、制限酵素 ClaI 及び NsiI で切断し、平滑末端化した後、自己連結反応を行なうことにより、エプスタイン・バーウイルス由来の EBNA1 発現ユニットを除去した発現ベクター pCEP4d を作製した。得られた発現ベクター pCEP4d を、制限酵素 NheI 及び BamHI で切断した後、アガロースゲル抽出することにより得られた約 7.7 kbp の DNA 断片に、配列番号 3 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをアニールさせて得られた二重鎖オリゴヌクレオチドを挿入することにより、発現ベクター pCEP4d-FLAG を作成した。なお、得られた発現ベクターが目的の配列を有することは、塩基配列により確認した。

得られた発現ベクター pCEP4d-FLAG を鋳型とし、配列番号 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとして、パイロベスト（PyroBest™）DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94℃（2 分間）で熱変性を行なった後、94℃（30 秒間）と 55℃（30 秒間）と 72℃（30 秒間）とからなるサイクルを 15 回繰り返す、最後に 72℃（7 分間）の伸長反応を行なった。前記 PCR により生じた約 0.4 kbp の DNA 断片を制限酵素 SpeI で切断した後、この DNA 断片を、制限酵素 XbaI で切断した pCEP4d-FLAG（約 7.7 Kbp）に挿入することにより、発現ベクター pCEPdE2-FLAG を作成した。得られた発現ベクター pCEPdE2-FLAG においては、プロモーターから下流に向かって、クローニングサイトである XbaI 認識配列、NheI 認識配列、NotI 認識配列、及び BamHI 認識配列、並びに FLAG タグが

この順に配列されている。

## 実施例 2：新規プロテアーゼ遺伝子 MDT S 9 の全長 ORF 遺伝子のクローニング

配列番号 7 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（5' 側に S p e I 認識配列及び K o z a k 配列が付加してある）と配列番号 8 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（5' 側に N o t I 認識配列が付加してある）との組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓 cDNA（Marathon-Ready™ cDNA；クロンテック社製）を鋳型として、DNAポリメラーゼ（TaKaRa LA Taq™；宝酒造社製）を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94℃（2 分間）で熱変性を行なった後、98℃（10 秒間）と 68℃（2 分 30 秒間）とからなるサイクルを 40 回繰り返し、最後に 68℃（7 分間）の伸長反応を行なった。前記 PCR により生成した約 2.2 kbp の DNA 断片（5' 側に S p e I 認識配列及び K o z a k 配列が付加され、3' 側に N o t I 認識配列が付加されている）を、プラスミド PCR 2.1（インビトロジェン社製）にサブクローンすることにより、クローン pMDTS9Cys1 を得た。

得られたプラスミド pMDTS9Cys1 を制限酵素 S p e I 及び N o t I で切断して生成した約 2.2 kbp の DNA 断片を、前記実施例 1 で構築した pCEPdE2-FLAG の XbaI 部位及び N o t I 部位に挿入することにより、プラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys1-FLAG を構築した。

配列番号 9 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（5' 側に S p e I 認識配列及び K o z a k 配列が付加してある）と配列番号 10 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓 cDNA（Marathon-Ready™ cDNA；クロンテック社製）を鋳型として、DNAポリメラーゼ（TaKaRa LA Taq™；宝酒造社製）を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94℃（2 分間）で熱変性を行なった後、98℃（10 秒間）と 68℃（30 秒間）とからなるサイクルを 45 回繰り返し、最後に 68℃（7 分間）の伸長反応を行なった。前記 PCR により生成した約 0.2 kbp の DNA 断片（5' 側に S p e I 認識配列及び

Kozak配列が付加されている)を、プラスミドPCR2.1 (インビトロジェン社製)にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9 (5S2-12)を得た。

得られたプラスミドpMDTS9 (5S2-12)を制限酵素SpeI及びNcoIで切断して生成した約0.2kbpのSpeI-NcoI DNA断片Aと、先に得られたプラスミドpMDTS9Cys1を制限酵素NcoI及びNotIで切断して生成した約2.0kbpのNcoI-NotI DNA断片Bとを、前記実施例1で構築したpCEPdE2-FLAGのXbaI部位及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを構築した。同様に、前記DNA断片Aと前記DNA断片Bとを、プラスミドpZERO-2 (インビトロジェン社製)のSpeI及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpZERO-MDTS9Cys2を構築した。

配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓cDNA (Marathon-Ready™ cDNA; クロンテック社製)を鋳型として、DNAポリメラーゼ (TaKaRa LA Taq™; 宝酒造社製)を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94℃ (2分間)で熱変性を行なった後、98℃ (10秒間)と68℃ (2分30秒間)とからなるサイクルを40回繰返し、最後に68℃ (7分間)の伸長反応を行なった。前記PCRにより生成した約2.1kbpのDNA断片を、プラスミドPCR2.1 (インビトロジェン社製)にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9-3Hを得た。

得られたプラスミドpMDTS9-3Hを制限酵素SphI及びNotIで切断して生成した約2.1kbpのDNA断片と、先に得られたプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを制限酵素SphI及びNotIで切断して生成した約9.3kbpのDNA断片とを連結することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9FuII-FLAGを構築した。

このプラスミドpCEPdE2-MDTS9FuII-FLAGは、新規プロ

テアーゼ遺伝子MDTS9の配列番号1で表される塩基配列における第1番～第3672番の塩基からなる遺伝子を含有し、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列のC末端に、配列番号21で表されるアミノ酸配列が付加したポリペプチドを、動物細胞を宿主として、発現することができる。

また、先に得られたプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGは、新規プロテアーゼ遺伝子MDTS9の配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなる遺伝子を含有し、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列のC末端に、配列番号21で表されるアミノ酸配列が付加したポリペプチドを、動物細胞を宿主として、発現することができる。なお、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ADAMTSプロテアーゼであると考えられる。

#### 実施例3：MDTS9短長タンパク質（MDTS9Cys2）及びMDTS9全長タンパク質（MDTS9Full）の発現

前記実施例2で作製したプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG又はプラスミドpCEPdE2-MDTS9Full-FLAG（あるいは、対照として、前記実施例1で作製したプラスミドpCEPdE2-FLAG）を、市販のトランスフェクション試薬（FuGENE™6 Transfection Reagent；ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて、添付指示書に従い、血清培地〔DMEM（GIBCO-BRL社）、10%牛胎児血清、100μg/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、及び250μg/mL-G418（ナカライテスク社製）〕で培養していたHEK293-EBNA細胞（インビトロジェン社製）に導入した。

プラスミド導入後、そのまま48時間培養する（以下、血清培養と称する）か、あるいは、前記プラスミド導入後、そのまま16時間培養し、PBSで2回洗浄した後に、無血清培地〔DMEM（GIBCO-BRL社）、100μg/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、250μg/mL-G418（ナカライテスク社製）〕にて32時間培養した（以下、無血清培養と称する）。

前記血清培養又は無血清培養で得られた各培養液を、遠心分離器（８８００型；久保田製作所社製）により遠心分離（３０００rpm，１０分間）することにより、培養上清を得た。また、前記培養液を除去した後に残った各細胞を、抽出液〔２０mmol/L-HEPES（pH7.4）、１％トリトンX-100、１％グリセロール、０.１％ウシ血清アルブミン（BSA）〕にて１５分間処理した後、ピペッティングにより細胞を培養プレートより剥離し、得られた細胞懸濁液を遠心分離器（８８００型；久保田製作所社製）により遠心分離（３０００rpm，１０分間）することにより、細胞膜結合画分（上清）と細胞画分（沈澱）とに分画した。

得られた各画分（すなわち、培養上清、細胞膜結合画分、及び細胞画分）における目的タンパク質の発現は、C末端に付加したFLAGタグに対する抗体（マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2；シグマ社製）を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、前記の各画分を、2-MEを用いた還元条件下、SDS／１０％～２０％アクリルアミドゲル（第一化学薬品社製）を用いて電気泳動した後、ブロッティング装置を用いてポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング剤（ブロックエース；大日本製薬社製）を添加してブロッキングした後、前記マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（ザイメッド社製又はタゴ社製）とを、順次反応させた。あるいは、前記ブロッキングに続いて、ビオチン化M2抗体（シグマ社製）と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出システム（ECLウエスタンブロッティング検出システム；アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを導入した細胞を無血清培養することにより得られた各画分において検出されたタンパク質（すなわち、MDTS9短長タンパク質）のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）における見かけ上の分子質量は、培養上清において約５５～６５KDaであり、細胞膜結合画分において約５５～６５KDaであり、細胞

画分において80～95KDaであった。一方、プラスミドpCEPdE2-MDT S9FuII-FLAGを導入した細胞を無血清培養することにより得られた各画分において検出されたタンパク質（すなわち、MDTS9全長タンパク質）は、主として細胞膜結合画分及び細胞画分に検出され、そのSDS-PAGEにおける見かけ上の分子質量は、いずれも約130～140KDaであった。

#### 実施例4：MDTS9短長タンパク質のプロテアーゼ活性の確認

(1) プラスミドpCEPdE2-MDT S9Cys2E/Q-FLAGの構築  
クイックチェンジ・サイトダイレクテド・ミュータジェネシス・キット (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit; ストラタジーン社製) を用い、添付の指示書に従って、活性中心と考えられるHis-Glu-Ser-Gly-His (配列番号22) のGlu (グルタミン酸) をGln (グルタミン) に置換した遺伝子MDTS9Cys2E/Qを含有するプラスミドpZER O-MDT S9Cys2E/Qを作製した。なお、鋳型としては、前記実施例2で作製したプラスミドpZER O-MDT S9Cys2を用い、プライマーセットとしては、配列番号13で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号14で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。

得られたプラスミドpZER O-MDT S9Cys2E/Qを制限酵素Spe I 及びNot I で切断して生成した約2.3kbpのDNA断片を、前記実施例1で構築したプラスミドpCEPdE2-FLAGのXba I 及びNot I 部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDT S9Cys2E/Q-FLAGを得た。

(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンとの複合体形成を指標としたプロテアーゼ活性の確認

前記実施例2で作製したプラスミドpCEPdE2-MDT S9Cys2-FLAG、又は前記実施例4(1)で作製したプラスミドpCEPdE2-MDT S9Cys2E/Q-FLAG (あるいは、対照として、前記実施例1で作製したプラスミドpCEPdE2-FLAG) でトランスフェクションした各細胞の血清培養の培養上清を、前記実施例3で示した手順と同様にして、2-MEを用



いた還元条件下、SDS-PAGEし、PVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング剤（ブロックエース；大日本製薬社製）を添加してブロッキングした後、ヤギ抗 $\alpha_2$ -マクログロブリン抗体〔セダーレーン（CEDAR LANE）社製〕と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgGポリクローナル抗体〔ザイメッド（Zymed Laboratories）社製〕とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出システム（ECLウエスタンブロッティング検出システム；アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGでトランスフェクションした細胞由来の血清培養の培養上清では、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG又はプラスミドpCEPdE2-FLAGでトランスフェクションした細胞由来の各血清培養の培養上清で検出されない約250KDaのバンドが検出された。この結果は、MDTS9短長タンパク質（MDTS9Cys2）が $\alpha_2$ -マクログロブリンと複合体を形成したことを示しており、従って、MDTS9短長タンパク質（MDTS9Cys2）にプロテアーゼ活性があることが確認された。

#### 実施例5：MDTS9遺伝子の組織発現分布の確認

市販のcDNAパネル〔Clontech社製のMultiple Tissue cDNA (MTC™) Panelの内、Human MTC Panel I（カタログ番号：K1420-1）、Human MTC Panel II（カタログ番号：K1421-1）、Human Fetal MTC Panel（カタログ番号：K1425-1）、及びHuman Tumor MTC Panel（カタログ番号：K1422-1）〕を用いて、MDTS9遺伝子の組織発現分布を以下の手順で解析した。

すなわち、配列番号15で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号16で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、前記cDNAパネルを鋳型として、DNAポリメラーゼ（Takara LA Taq™；宝酒造社製）を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94℃（2分間）で熱変性を行なった後、98℃（10秒間）と6

8℃（1分30秒間）とからなるサイクルを44回繰り返した。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動を行ない、MDTS9遺伝子のmRNAに由来する約1.1kbpのDNA断片を検出した。その結果、MDTS9遺伝子のmRNAは、腎臓に発現していることが判明した。

#### 実施例6：TGF- $\beta$ によるMDTS9遺伝子の発現誘導

##### （1）鋳型cDNAの調製

6穴プレート（旭テクノグラス社製）に正常ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞〔クロネテクス（Clonetics）社製〕を $5 \times 10^5$ 個となるように撒き、腎上皮細胞培地キット（クロネテクス社製）で1日間培養した。無血清の腎上皮細胞培地に変換し、更に1日間培養した後、TGF- $\beta$ 1（シグマ社製）を終濃度10ng/mlとなるように添加した無血清の腎上皮細胞培地に交換し、24時間培養した。なお、対照群は、TGF- $\beta$ 1を添加していない無血清の腎上皮細胞培地に交換し、24時間培養した。

各処理群から、それぞれ、市販の総RNA精製試薬（ISOGEN；日本ジーン社製）を用いて総RNAを調製した。得られた総RNAをDNアーゼ（日本ジーン社製）を用いて、37℃で90分間反応させた。DNアーゼ処理した総RNA 0.5 $\mu$ gをスーパースクリプト・ファーストストランドシステム（RT-PCR用）（GIBCO-BRL社製）を用いてcDNAに変換した。

##### （2）定量PCRによるMDTS9遺伝子のmRNAの定量

正常ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞での発現変動解析は、前記実施例6（1）で調製したcDNAを鋳型として、シークエンスディテクター（Prism7700 Sequence Detector；アプライドバイオシステムズ社製）を用いて行なった。なお、プライマーセットとしては、配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせを使用した。また、PCRは、市販のPCR試薬（SYBR Green PCR core reagent；アプライド・バイオシステムズ社製）を用い、95℃（10分間）の初期変性反応を実施した後、94℃（15秒間）と60℃（30秒間）と72℃（60秒間）とからなるサイクル反応を40回繰り返すことにより実施した。

なお、内部標準としてヒト $\beta$ アクチンの遺伝子発現量を算出するために、前記cDNAを鋳型とし、配列番号19で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号20で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーセットとし、同条件のPCRを行なった。また、mRNA発現量算出の標準曲線を得るために、前記実施例6(1)で調製したTGF- $\beta$ 1無刺激のヒト腎臓近位尿細管上皮細胞cDNAを鋳型とし、前記プライマーセット(すなわち、配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、あるいは、配列番号19で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号20で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ)を用いて同条件のPCRを行なった。一定量の総RNA当たりのMDTS9遺伝子のmRNAの発現量を得るため、各条件でのMDTS9遺伝子のmRNAの発現量は、各条件での $\beta$ アクチン遺伝子発現量に対する割合で示した。その結果、MDTS9遺伝子のmRNAは、TGF- $\beta$ 1により、約8倍に遺伝子発現誘導されることが判明した。

#### 実施例7：ラット腎不全モデルにおけるMDTS9遺伝子の発現変動

##### (1) 鋳型cDNAの調製

cDNAの調製は、ラット5/6腎摘モデル(木村健二郎,「腎と透析」1991臨時増刊号,431-439)の腎臓より調製した。5/6腎摘終了後、1週、2週、3週、4週、6週、8週、及び10週に、5/6腎摘ラット及び偽手術ラットを各々5匹ずつ解剖し、腎臓を摘出し、その後直ちに-80℃にて凍結保存した。これら各群の腎臓を液体窒素凍結下、細胞破碎機(クライオプレスC P-100; マイクロテック・ニチオン社製)を用いて破碎後、総RNA精製試薬(ISOGEN; 日本ジーン社製)を用いて総RNAを調製した。抽出した総RNAをDNアーゼ(ニッポンジーン社製)を用い、37℃で90分間反応させた。DNアーゼ処理した総RNA 0.25  $\mu$ gをスーパースクリプトIIファーストストランドシステム(RT-PCR用)(GIBCO-BRL社製)にてcDNAに変換した。

##### (2) 定量PCRによるラットMDTS9カウンターパートのmRNAの定量

ラット腎不全モデルにおける腎臓での発現変動解析は、実施例7(1)で調製したcDNAを鋳型にして、シーケンスディテクター(Prism 7700 Sequence Detector; アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行なった。配列番号23で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号24で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして用いた。PCRは、市販のPCR試薬[サイバーグリーンPCRコアリエージェント(SYBR Green PCR core reagent); アプライドバイオシステムズ社製]を用い、95℃(10分間)の初期変性反応を実施した後、94℃(15秒間)と60℃(30秒間)と72℃(60秒間)とからなるサイクル反応を45回繰り返すことにより実施した。

また、内部標準としてヒトグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(G3PDH)の遺伝子発現量を算出するため、前記cDNAを鋳型として、配列番号25で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号26で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして同条件のPCRを行なった。更に、mRNA発現量算出に用いる標準曲線を得るために、ラットゲノムDNA(クロンテック社製)を鋳型として、前記プライマーセットを用いて同条件のPCRを行なった。各群における一定量の総RNA当たりのラットMDTS9遺伝子のmRNAの発現量を比較するため、各条件でのラットMDTS9遺伝子のmRNAの発現量は、各条件でのG3PDH遺伝子発現量に対する割合で示した。その結果、ラットMDTS9遺伝子のmRNAは、5/6腎摘モデルにおいて、偽手術ラットに比べ、術後1週で約5倍の遺伝子が発現しており、尿タンパク質量が顕著に増加する術後3週、正常腎重量と比べ著明に腎重量が増加し始める術後6週、更に病態が悪化する術後8週で、それぞれ、約2倍の遺伝子が発現していることが判明した。

本実施例により、腎不全モデルでは、MDTS9の遺伝子が発現誘導されることが明らかとなった。

#### 実施例8：ヒト腎臓組織切片の免疫組織染色

##### (1) 抗ヒトMDTS9抗体の作製

まず、実験解説書(岡田雅人及び宮崎香編、「改訂タンパク質実験ノート」上、

羊土社, p. 162-179) ] に準じて、プラスミド pGEX-6P-1 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を発現ベクターとして用い、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第280番～第410番のアミノ酸からなるペプチドと、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質 (GST-MDTS9A) を、大腸菌を用いて封入体画分に生産した。続いて、封入体画分について、調製用 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を実施し、ゲルから拡散法によって目的の GST-MDTS9A タンパク質を抽出した (岡田雅人及び宮崎香編, 「改訂タンパク質実験ノート」 下, 羊土社, p. 48-51) 。

得られた GST-MDTS9A タンパク質を、ウサギ (日本白色種) に 10～14 日間隔で計 5 回免疫した後、抗血清を調製した。この抗血清より、まず IgG 画分をプロテイン G セファロース FF カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) でアフィニティー精製し、続いて、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第280番～第410番のアミノ酸からなるペプチドと、マンノース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-MDTS9A) を固定したカラム (MBP-MDTS9A カラム) でアフィニティー精製を行ない、抗ヒト MDTS9 抗体とした。プロテイン G セファロース FF カラムでのアフィニティー精製、並びに CNBr 活性化セファロース FF カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) への MBP-MDTS9A の固定及び MBP-MDTS9A カラムでのアフィニティー精製は、添付説明書に従った。また、MBP-MDTS9A の大腸菌での生産及び精製は、pMAL-c2E (ニュー・イングランド・バイオラボ社製) を発現ベクターとして用い、同社の「pMAL 蛋白融合及び精製システム」の指示書に従った。

## (2) ヒト腎臓での MDTS9 タンパク質の検出

スライドガラス上にホルマリン固定及びパラフィン包埋した組織切片に、実施例 8 (1) で調製した抗ヒト MDTS9 抗体を反応させた後、市販の染色キット (ベクタステイン ABC-AP キット, カタログ番号 AK-5000; ベクター社製) を用いて、添付説明書に従い、染色した。その際、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体 (カタログ番号 BA-1000; ベクター社製)、発色基質

としてアルカリフォスファターゼ基質キット I（カタログ番号 SK-5100；ベクター社製）を用いた。その結果、健常人及び糖尿病性腎症（初期又は後期）患者の腎臓において、上皮細胞、中でも特に糸球体上皮細胞（podocytes）での染色が認められた。

本実施例から、MDTS9タンパク質がヒト腎臓で発現していることが明らかである。

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは、 $TGF-\beta$ により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与する、腎臓に発現している新規プロテアーゼであるので、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質は、 $TGF-\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療剤として有用である。すなわち、本発明のポリペプチドによれば、慢性腎不全治療剤の簡便なスクリーニング系を提供することができる。また、本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞、及び抗体は、本発明のポリペプチドを製造するのに有用である。

#### 配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号3及び4の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したリンカー配列である。また、配列表の配列番号5～9及び12～14の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。更に、配列表の配列番号21の配列で表されるアミノ酸配列は、制限酵素Not I 認識ヌクレオチド配列及びFLAGタグアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNAの発現により得られるアミノ酸配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

## 請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
3. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
4. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
5. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
6. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における

第 1 番～第 1 2 2 4 番のアミノ酸からなるポリペプチド。

7. 請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

8. 請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

9. 請求項 8 に記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

10. 請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合する抗体又はその断片。

11. 請求項 9 に記載の細胞を培養し、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドを回収することを含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドの製造方法。

12. (1) 請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドと、(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが、SDS 及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成するか否かを分析する工程を含む、試験化合物が前記ポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する方法。

13. 請求項 12 に記載の方法による検出工程、及びプロテアーゼ活性を阻害する物質を選択する工程を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

14. 請求項 13 に記載の方法により、慢性腎不全治療用物質をスクリーニングする方法。

15. 請求項 12 に記載の方法による検出工程、及び製剤化工程

を含む、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法。



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; Novel protease

&lt;130&gt; Y0132PCT-664

&lt;150&gt; JP 2000-393372

&lt;151&gt; 2000-12-25

&lt;160&gt; 26

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3675

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (3675)

&lt;400&gt; 1

atg aag ccc cgc gcg cgc gga tgg cgg ggc ttg gcg gcg ctg tgg atg	48
Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met	
1 5 10 15	

ctg ttg gcg cag gtg gcc gag cag gca cct gcg tgc gcc atg gga ccc	96
Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro	
20 25 30	

gca gcg gca gcg cct ggg agc ccg agc gtc ccg cgt cct cct cca ccc	144
Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro	
35 40 45	

gcg gag cgg ccg ggc tgg atg gaa aag ggc gaa tat gac ctg gtc tct	192
Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser	
50 55 60	

gcc tac gag gtt gac cac agg ggc gat tac gtg tcc cat gaa atc atg	240
Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met	
65 70 75 80	

cac cat cag cgg cgg aga aga gca gtg gcc gtg tcc gag gtt gag tct	288
His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser	
85 90 95	

2/17

ctt cac ctt cgg ctg aaa ggc tcc agg cac gac ttc cac gtg gat ctg	336
Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu	
100 105 110	
agg act tcc agc agc cta gtg gct cct ggc ttt att gtg cag acg ttg	384
Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu	
115 120 125	
gga aag aca ggc act aag tct gtg cag act tta ccg cca gag gac ttc	432
Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe	
130 135 140	
tgt ttc tat caa ggc tct ttg cga tca cac aga aac tcc tca gtg gcc	480
Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala	
145 150 155 160	
ctt tca acc tgc caa ggc ttg tca ggc atg ata cga aca gaa gag gca	528
Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala	
165 170 175	
gat tac ttc cta agg cca ctt cct tca cac ctc tca tgg aaa ctc ggc	576
Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly	
180 185 190	
aga gct gcc caa ggc agc tog cca tcc cac gta ctg tac aag aga tcc	624
Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser	
195 200 205	
aca gag ccc cat gct cct ggg gcc agt gag gtc ctg gtg acc tca agg	672
Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg	
210 215 220	
aca tgg gag ctg gca cat caa ccc ctg cac agc agc gac ctt cgc ctg	720
Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu	
225 230 235 240	
gga ctg cca caa aag cag cat ttc tgt gga aga cgc aag aaa tac atg	768
Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met	
245 250 255	
ccc cag cct ccc aag gaa gac ctc ttc atc ttg cca gat gag tat aag	816
Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys	
260 265 270	
tct tgc tta cgg cat aag cgc tct ctt ctg agg tcc cat aga aat gaa	864

3/17

Ser	Cys	Leu	Arg	His	Lys	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser	His	Arg	Asn	Glu	
		275					280					285				
gaa	ctg	aac	gtg	gag	acc	ttg	gtg	gtg	gtc	gac	aaa	aag	atg	atg	caa	912
Glu	Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Val	Val	Asp	Lys	Lys	Met	Met	Gln	
		290				295					300					
aac	cat	ggc	cat	gaa	aat	atc	acc	acc	tac	gtg	ctc	acg	ata	ctc	aac	960
Asn	His	Gly	His	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Tyr	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	Asn	
305					310					315					320	
atg	gta	tct	gct	tta	ttc	aaa	gat	gga	aca	ata	gga	gga	aac	atc	aac	1008
Met	Val	Ser	Ala	Leu	Phe	Lys	Asp	Gly	Thr	Ile	Gly	Gly	Asn	Ile	Asn	
				325					330					335		
att	gca	att	gta	ggt	ctg	att	ctt	cta	gaa	gat	gaa	cag	cca	gga	ctg	1056
Ile	Ala	Ile	Val	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Asp	Glu	Gln	Pro	Gly	Leu	
			340					345					350			
gtg	ata	agt	cac	cac	gca	gac	cac	acc	tta	agt	agc	ttc	tgc	cag	tgg	1104
Val	Ile	Ser	His	His	Ala	Asp	His	Thr	Leu	Ser	Ser	Phe	Cys	Gln	Trp	
		355					360					365				
cag	tct	gga	ttg	atg	ggg	aaa	gat	ggg	act	cgt	cat	gac	cac	gcc	atc	1152
Gln	Ser	Gly	Leu	Met	Gly	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	His	Asp	His	Ala	Ile	
		370				375					380					
tta	ctg	act	ggt	ctg	gat	ata	tgt	tcc	tgg	aag	aat	gag	ccc	tgt	gac	1200
Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Ile	Cys	Ser	Trp	Lys	Asn	Glu	Pro	Cys	Asp	
385					390					395				400		
act	ttg	gga	ttt	gca	ccc	ata	agt	gga	atg	tgt	agt	aaa	tat	cgc	agc	1248
Thr	Leu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Met	Cys	Ser	Lys	Tyr	Arg	Ser	
				405				410						415		
tgc	acg	att	aat	gaa	gat	aca	ggt	ctt	gga	ctg	gcc	ttc	acc	att	gcc	1296
Cys	Thr	Ile	Asn	Glu	Asp	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Thr	Ile	Ala	
			420					425				430				
cat	gag	tct	gga	cac	aac	ttt	ggc	atg	att	cat	gat	gga	gaa	ggg	aac	1344
His	Glu	Ser	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Met	Ile	His	Asp	Gly	Glu	Gly	Asn	
		435					440					445				
atg	tgt	aaa	aag	tcc	gag	ggc	aac	atc	atg	tcc	cct	aca	ttg	gca	gga	1392
Met	Cys	Lys	Lys	Ser	Glu	Gly	Asn	Ile	Met	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	Gly	
		450				455					460					



5/17

Pro	Arg	Asp	Ser	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Ala	Gln	Cys	Ala	Glu	His	Asn	
				645					650					655		
agc	aga	cga	ttc	aga	ggg	cgg	cac	tac	aag	tgg	aag	cct	tac	act	caa	2016
Ser	Arg	Arg	Phe	Arg	Gly	Arg	His	Tyr	Lys	Trp	Lys	Pro	Tyr	Thr	Gln	
			660					665					670			
gta	gaa	gat	cag	gac	tta	tgc	aaa	ctc	tac	tgt	atc	gca	gaa	gga	ttt	2064
Val	Glu	Asp	Gln	Asp	Leu	Cys	Lys	Leu	Tyr	Cys	Ile	Ala	Glu	Gly	Phe	
			675				680					685				
gat	ttc	ttc	ttt	tct	ttg	tca	aat	aaa	gtc	aaa	gat	ggg	act	cca	tgc	2112
Asp	Phe	Phe	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Lys	Asp	Gly	Thr	Pro	Cys	
	690						695				700					
tgc	gag	gat	agc	cgt	aat	gtt	tgt	ata	gat	ggg	ata	tgt	gag	aga	gtt	2160
Ser	Glu	Asp	Ser	Arg	Asn	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Cys	Glu	Arg	Val	
705					710					715					720	
gga	tgt	gac	aat	gtc	ctt	gga	tct	gat	got	gtt	gaa	gac	gtc	tgt	ggg	2208
Gly	Cys	Asp	Asn	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Ala	Val	Glu	Asp	Val	Cys	Gly	
				725					730					735		
gtg	tgt	aac	ggg	aat	aac	tca	gcc	tgc	acg	att	cac	agg	ggt	ctc	tac	2256
Val	Cys	Asn	Gly	Asn	Asn	Ser	Ala	Cys	Thr	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Tyr	
			740					745					750			
acc	aag	cac	cac	cac	acc	aac	cag	tat	tat	cac	atg	gtc	acc	att	cct	2304
Thr	Lys	His	His	His	Thr	Asn	Gln	Tyr	Tyr	His	Met	Val	Thr	Ile	Pro	
			755				760					765				
tct	gga	gcc	cgg	agt	atc	cgc	atc	tat	gaa	atg	aac	gtc	tct	acc	tcc	2352
Ser	Gly	Ala	Arg	Ser	Ile	Arg	Ile	Tyr	Glu	Met	Asn	Val	Ser	Thr	Ser	
	770					775					780					
tac	att	tct	gtg	cgc	aat	gcc	ctc	aga	agg	tac	tac	ctg	aat	ggg	cac	2400
Tyr	Ile	Ser	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Gly	His	
785					790				795					800		
tgg	acc	gtg	gac	tgg	ccc	ggc	cgg	tac	aaa	ttt	tgc	ggc	act	act	ttc	2448
Trp	Thr	Val	Asp	Trp	Pro	Gly	Arg	Tyr	Lys	Phe	Ser	Gly	Thr	Thr	Phe	
				805					810					815		
gac	tac	aga	cgg	tcc	tat	aat	gag	ccc	gag	aac	tta	atc	gct	act	gga	2496
Asp	Tyr	Arg	Arg	Ser	Tyr	Asn	Glu	Pro	Glu	Asn	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly	
			820					825					830			

6/17

cca acc aac gag aca ctg att gtg gag ctg ctg ttt cag gga agg aac	2544
Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn	
835 840 845	
ccg ggt gtt gcc tgg gaa tac tcc atg cct cgc ttg ggg acc gag aag	2592
Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys	
850 855 860	
cag ccc cct gcc cag ccc agc tac act tgg gcc atc gtg cgc tct gag	2640
Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu	
865 870 875 880	
tgc tcc gtg tcc tgc gga ggg gga cag atg acc gtg aga gag ggc tgc	2688
Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys	
885 890 895	
tac aga gac ctg aag ttt caa gta aat atg tcc ttc tgc aat ccc aag	2736
Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys	
900 905 910	
aca cga cct gtc acg ggg ctg gtg cct tgc aaa gta tct gcc tgt cct	2784
Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro	
915 920 925	
ccc agc tgg tcc gtg ggg aac tgg agt gcc tgc agt cgg acg tgt ggc	2832
Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly	
930 935 940	
ggg ggt gcc cag agc cgc ccc gtg cag tgc aca cgg cgg gtg cac tat	2880
Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr	
945 950 955 960	
gac tcg gag cca gtc ccg gcc agc ctg tgc cct cag cct gct ccc tcc	2928
Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser	
965 970 975	
agc agg cag gcc tgc aac tct cag agc tgc cca cct gca tgg agc gcc	2976
Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala	
980 985 990	
ggg ccc tgg gca gag tgc tca cac acc tgt ggg aag ggg tgg agg aag	3024
Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys	
995 1000 1005	
cgg gca gtg gcc tgt aag agc acc aac ccc tcg gcc aga gcg cag ctg	3072

7/17

Arg	Ala	Val	Ala	Cys	Lys	Ser	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Arg	Ala	Gln	Leu		
1010						1015					1020						
ctg	ccc	gac	gct	gtc	tgc	acc	tcc	gag	ccc	aag	ccc	agg	atg	cat	gaa	3120	
Leu	Pro	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Glu	Pro	Lys	Pro	Arg	Met	His	Glu		
1025					1030					1035					1040		
gcc	tgt	ctg	ctt	cag	cgc	tgc	cac	aag	ccc	aag	aag	ctg	cag	tgg	ctg	3168	
Ala	Cys	Leu	Leu	Gln	Arg	Cys	His	Lys	Pro	Lys	Lys	Leu	Gln	Trp	Leu		
			1045						1050					1055			
gtg	tcc	gcc	tgg	tcc	cag	tgc	tct	gtg	aca	tgt	gaa	aga	gga	aca	cag	3216	
Val	Ser	Ala	Trp	Ser	Gln	Cys	Ser	Val	Thr	Cys	Glu	Arg	Gly	Thr	Gln		
		1060						1065					1070				
aaa	aga	ttc	tta	aaa	tgt	gct	gaa	aag	tat	gtt	tct	gga	aag	tat	cga	3264	
Lys	Arg	Phe	Leu	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Tyr	Val	Ser	Gly	Lys	Tyr	Arg		
	1075						1080					1085					
gag	ctg	gcc	tca	aag	aag	tgc	tca	cat	ttg	cgc	aag	ccc	agc	ctg	gag	3312	
Glu	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	His	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Leu	Glu		
	1090					1095					1100						
ctg	gaa	cgt	gcc	tgc	gcc	ccg	ctt	cca	tgc	ccc	agg	cac	ccc	cca	ttt	3360	
Leu	Glu	Arg	Ala	Cys	Ala	Pro	Leu	Pro	Cys	Pro	Arg	His	Pro	Pro	Phe		
1105					1110					1115					1120		
gct	gct	gcg	gga	ccc	tgc	agg	ggc	agc	tgg	ttt	gcc	tca	ccc	tgg	tct	3408	
Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ser	Arg	Gly	Ser	Trp	Phe	Ala	Ser	Pro	Trp	Ser		
			1125						1130					1135			
cag	tgc	acg	gcc	agc	tgt	ggg	gga	ggc	gtt	cag	acg	agg	tcc	gtg	cag	3456	
Gln	Cys	Thr	Ala	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Thr	Arg	Ser	Val	Gln		
			1140					1145					1150				
tgc	ctg	gct	ggg	ggc	cgg	ccg	gcc	tca	ggc	tgc	ctc	ctg	cac	cag	aag	3504	
Cys	Leu	Ala	Gly	Gly	Arg	Pro	Ala	Ser	Gly	Cys	Leu	Leu	His	Gln	Lys		
	1155						1160					1165					
cct	tgc	gcc	tcc	ctg	gcc	tgc	aac	act	cac	ttc	tgc	ccc	att	gca	gag	3552	
Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Cys	Asn	Thr	His	Phe	Cys	Pro	Ile	Ala	Glu		
	1170					1175					1180						
aag	aaa	gat	gcc	ttc	tgc	aaa	gac	tac	ttc	cac	tgg	tgc	tac	ctg	gta	3600	
Lys	Lys	Asp	Ala	Phe	Cys	Lys	Asp	Tyr	Phe	His	Trp	Cys	Tyr	Leu	Val		
1185					1190					1195					1200		

8/17

ccc cag cac ggg atg tgc agc cac aag ttc tac ggc aag cag tgc tgc 3648  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
                   1205                  1210                  1215

aag act tgc tct aag tcc aac ttg tga 3675  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
                   1220                  1225

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1224

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met  
   1                  5                  10                  15  
 Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro  
                   20                  25                  30  
 Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro  
                   35                  40                  45  
 Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser  
                   50                  55                  60  
 Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met  
   65                  70                  75                  80  
 His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser  
                   85                  90                  95  
 Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu  
                   100                  105                  110  
 Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu  
                   115                  120                  125  
 Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe  
                   130                  135                  140  
 Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala  
   145                  150                  155                  160  
 Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala  
                   165                  170                  175  
 Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly  
                   180                  185                  190  
 Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser  
                   195                  200                  205  
 Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg  
                   210                  215                  220  
 Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu  
   225                  230                  235                  240





10/17

Arg	Ser	Arg	Leu	Cys	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Ser	His	Gly	Gly	Lys	Phe
610						615					620				
Cys	Glu	Gly	Ser	Thr	Arg	Thr	Leu	Lys	Leu	Cys	Asn	Ser	Gln	Lys	Cys
625					630					635					640
Pro	Arg	Asp	Ser	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Ala	Gln	Cys	Ala	Glu	His	Asn
				645					650					655	
Ser	Arg	Arg	Phe	Arg	Gly	Arg	His	Tyr	Lys	Trp	Lys	Pro	Tyr	Thr	Gln
			660				665						670		
Val	Glu	Asp	Gln	Asp	Leu	Cys	Lys	Leu	Tyr	Cys	Ile	Ala	Glu	Gly	Phe
		675					680					685			
Asp	Phe	Phe	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Lys	Asp	Gly	Thr	Pro	Cys
690						695					700				
Ser	Glu	Asp	Ser	Arg	Asn	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Cys	Glu	Arg	Val
705					710					715					720
Gly	Cys	Asp	Asn	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Ala	Val	Glu	Asp	Val	Cys	Gly
				725					730					735	
Val	Cys	Asn	Gly	Asn	Asn	Ser	Ala	Cys	Thr	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Tyr
			740					745					750		
Thr	Lys	His	His	His	Thr	Asn	Gln	Tyr	Tyr	His	Met	Val	Thr	Ile	Pro
		755				760						765			
Ser	Gly	Ala	Arg	Ser	Ile	Arg	Ile	Tyr	Glu	Met	Asn	Val	Ser	Thr	Ser
770						775					780				
Tyr	Ile	Ser	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Gly	His
785					790					795					800
Trp	Thr	Val	Asp	Trp	Pro	Gly	Arg	Tyr	Lys	Phe	Ser	Gly	Thr	Thr	Phe
				805					810					815	
Asp	Tyr	Arg	Arg	Ser	Tyr	Asn	Glu	Pro	Glu	Asn	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly
			820					825					830		
Pro	Thr	Asn	Glu	Thr	Leu	Ile	Val	Glu	Leu	Leu	Phe	Gln	Gly	Arg	Asn
		835					840					845			
Pro	Gly	Val	Ala	Trp	Glu	Tyr	Ser	Met	Pro	Arg	Leu	Gly	Thr	Glu	Lys
850						855					860				
Gln	Pro	Pro	Ala	Gln	Pro	Ser	Tyr	Thr	Trp	Ala	Ile	Val	Arg	Ser	Glu
865					870					875					880
Cys	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Gln	Met	Thr	Val	Arg	Glu	Gly	Cys
				885					890					895	
Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Phe	Gln	Val	Asn	Met	Ser	Phe	Cys	Asn	Pro	Lys
			900					905					910		
Thr	Arg	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Val	Pro	Cys	Lys	Val	Ser	Ala	Cys	Pro
		915					920					925			
Pro	Ser	Trp	Ser	Val	Gly	Asn	Trp	Ser	Ala	Cys	Ser	Arg	Thr	Cys	Gly
						935					940				
Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	His	Tyr
945					950					955					960
Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Cys	Pro	Gln	Pro	Ala	Pro	Ser
				965					970					975	

11/17

Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala  
                   980                                  985                                  990  
 Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys  
                   995                                  1000                                  1005  
 Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu  
                   1010                                  1015                                  1020  
 Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu  
                   1025                                  1030                                  1035                                  1040  
 Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu  
                   1045                                  1050                                  1055  
 Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln  
                   1060                                  1065                                  1070  
 Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg  
                   1075                                  1080                                  1085  
 Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu  
                   1090                                  1095                                  1100  
 Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe  
                   1105                                  1110                                  1115                                  1120  
 Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser  
                   1125                                  1130                                  1135  
 Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln  
                   1140                                  1145                                  1150  
 Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys  
                   1155                                  1160                                  1165  
 Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu  
                   1170                                  1175                                  1180  
 Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val  
                   1185                                  1190                                  1195                                  1200  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
                   1205                                  1210                                  1215  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
                   1220

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized linker sequence

&lt;400&gt; 3

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa

50

12/17

<210> 4  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized linker sequence

<400> 4  
gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 5  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 5  
ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 6  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

<400> 6  
ggactagtgt cgaccggtca tggctgcgc 29

<210> 7  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

13/17

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 7

ggactagtgc catgggaccc gcagcggcag cgcctggg

38

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 8

gggcggccgc acccctgtga atcgtgcagg ctgagttatt

40

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

ggactagtac catgaagccg cgcgcgcgcg gatggcggg c

41

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

ccctgtggtc aacctcgtag gcagagacca

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggcagttcgg agagaaagcc aagctct

27

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

<400> 12

gggcggccgc caagttggac ttagagcaag tcttgacga

40

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

<400> 13

tggccttcac cattgcccat cagtctggac acaactttgg c

41

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

<400> 14

gccaaagttg tgtccagact gatgggcaat ggtgaaggcc a

41

<210> 15

15/17

<211> 31  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
caccttaagt agcttctgcc agtggcagtc t 31

<210> 16  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
acaaacatta cggctatcct ccgagcatgg ag 32

<210> 17  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
ttctaagcac cgctcaagct atc 23

<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 18  
gggccttcac caccatattt ca 22

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
ccatgccatc ctgogtctg 19

<210> 20  
<211> 20

16/17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

aggggccgga ctggtcatac

20

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an amino acid sequence obtained by expression of a DNA containing a restriction enzyme NotI recognition nucleotide sequence and a nucleotide sequence encoding a FLAG tag amino acid sequence

&lt;400&gt; 21

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

His Glu Ser Gly His  
1 5

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus sp.

&lt;400&gt; 23

agcctagctc ccgatccaa

19

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus sp.



&lt;400&gt; 24

ccaccaccag agtctccaca t

21

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus sp.

&lt;400&gt; 25

aagcaggcgg ccgag

15

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus sp.

&lt;400&gt; 26

atcaaagggtg gaagaatggg a

21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11251

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/40, C12N5/10, C12N9/50, G01N33/15,  
G01N33/50, G01N33/573//C12P21/08, C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/40, C12N5/10, C12N9/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TORTORELLA M. et al., The thrombospondin Motif of AggreCANase-1 (ADAMTS-4) Is Critical for AggreCAN Substrate Recognition and Cleavage. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug.2000, Vol.275, No.33, pages 25791 to 25797	1-15
A	COLIGE A. et al., Human Ehlers-Danlos Syndrome Type VII CanD Bovine Dermatosparaxis Are Caused by Mutations in the Procollage I N-Proteinase Gene., Am.J.Hum.Genet., 1999, Vol.65, pages 308 to 317	1-15
A	ABBASZADE, I. et al., Cloning and Characterization of ADAMTS11, an AggreCANase from the ADAMTS Family., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug.1999, Vol.274, No.33, pages 23443 to 23450	1-15
A	CARNINCI P. et al., Normalization and Subtraction of Cap-Trapper-Selected cDNAs to Prepare Full-Length cDNA Libraries for Rapid Discovery of New Genes., Genome Research, 2000, Vol.10, pages 1617 to 1630	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 March, 2002 (12.03.02)

Date of mailing of the international search report  
09 April, 2002 (09.04.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/11251

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C07K 16/40, C12N 5/10, C12N 9/50, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/573  
// C12P 21/08, C12Q 1/37

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C07K 16/40, C12N 5/10, C12N 9/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TORTORELLA M. et al., The Thrombospondin Motif of AggreCANase-1 (ADAMTS-4) Is Critical for AggreCAN Substrate Recognition and Cleavage. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug. 2000, Vol. 275, No. 33, p. 25791-25797.	1-15
A	COLIGE A. et al., Human Ehlers-Danlos Syndrome Type VII and Bovine Dermatosparaxis Are Caused by Mutations in the Procollagen I N-Proteinase Gene., Am. J. Hum. Genet., 1999, Vol. 65, p. 308-317	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.03.02

国際調査報告の発送日

0904.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ABBASZADE I. et al., Cloning and Characterization of <i>ADAMTS11</i> , an Aggrecanase from the ADAMTS Family., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug. 1999, Vol. 274, No. 33, p. 23443-23450	1-15
A	CARNINCI P. et al., Normalization and Subtraction of Cap-Trapper-Selected cDNAs to Prepare Full-Length cDNA Libraries for Rapid Discovery of New Genes., Genome Research, 2000, Vol. 10, p. 1617-1630	1-15